

補助事業番号 2017M-143

補助事業名 2017年度 自転車等機械振興事業に関する補助事業 液液界面を用いてパターンニングしたモータタンパク質の分子計測 補助事業

補助事業者名 京都大学 横川隆司

1 研究の概要

本研究の目的は、細胞内運動を司るモータタンパク質(以下、モータとも称す)の協働的な運動機能を理解するための分子計測プラットフォームをマイクロ・ナノ加工技術および高分子化合物により製作し、マルチモータについてその運動機能を評価することである。細胞内では、様々なタンパク質などの存在によりモータ個別の機能を評価することが難しいため、その分子系をin vitroに再構築して評価することを目指す。

具体的には、「異種タンパク質のパターンニングに関する研究」として、マイクロチャンネル内の層流を利用したモータタンパク質のパターンニング方法とAqueous Two Phase System (ATPS)を利用したモータタンパク質のパターンニング方法を検討する。さらに、「マルチモータ運動の評価に関する研究」では、上記のパターンニング技術が、逆極性のモータによる分子綱引きアッセイに応用できることを示す。細胞内では極性の異なる複数のモータが相互作用しながら細胞内の機能を発現しているため、これをin vitroに再構築する例として、本研究では微小管の綱引きの実現を目指す。

2 研究の目的と背景

毎年、98万人が新たにがんと診断され、死亡数は37万人にのぼる。我が国における死因のトップであり、高齢者人口の増加に伴い来年には患者数は100万人の大台に乗ると予想されている。これまでの抗がん剤開発では、細胞分裂を抑制することを主眼としたアプローチが多く、がん細胞に限らずあらゆる細胞の増殖を抑えてしまうため、副作用が大きかった。これに対し、近年の有糸分裂キネシンを標的とした分子標的抗がん剤は、がん細胞特異的に発現しているキネシンをターゲットにできるため、副作用の少ない効果的な抗がん剤として期待されている。

有糸分裂キネシンを標的とした抗がん剤の開発が進むことで、がん患者が副作用に苦しむことなく治療を迅速に終わらせることを目指す。このためには、キネシンが細胞内でどのように機械的な運動機構を担っているのかを理解することが必須である。1分子から数分子ではその挙動が解明されてきたが、数100分子レベルでの力学機構や外力に対する応答性は理解されていない。機械工学的な立場から、この理解に資するアッセイ系を開発することで、的確な抗がん剤開発に必要な分子レベルでの知見を提供し、分子標的薬の開発を通じたQOLの改善を目指す。

3 研究内容

①マイクロチャンネルによるパターンニング

・チャンネルの設計と製作

ソフトリソグラフィによりPDMSにY字型マイクロチャンネルをパターンニングして、ガラスと接合することで二液の層流を形成できる微小流体デバイスを製作した。デバイスのサイズは、幅500 umのマ

マイクロチャンネル二本が合流し幅1 mmとなるように設計し、深さは100 μm とした(図1)。

・高粘性溶液を用いたタンパク質の活性評価

ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン(DEX)の高分子がキネシンとダイニンに対してどのような影響を与えるかを運動速度により評価した。キネシンは10–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ダイニンは10–60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PEGは0–15%, DEXは0–2.5%の間で網羅的に微小管の運動アッセイをおこなった。速度低下が見られるものの、安定した微小管運動を観察することができた。

・層流形成による異種タンパク質のパターニング

モータタンパク質を固定するためのBSA-biotin, StreptavidinをまずY字チャンネルに導入し、キネシンおよびダイニンを30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で2つのインレットからそれぞれ導入した。最後に微小管を導入し層流界面での運動を評価した。

②ATPSによるパターニング

・ATPSの最適化

PEG・DEXを含む溶液に、キネシン／ダイニンのどちらかを混合した溶液を遠心分離することで、二相に分離した。このとき溶液が二相に分かれていることを目視で確認した。さらに、モータタンパク質を含むATPSからtop phase, bottom phaseを分取し、モータタンパク質を含まないATPSから分取したtop phase, bottom phaseを用いてATPS系を再構成した。その後、二相のタンパク質濃度の時間変化を測定した。

・ATPSによる異種タンパク質のパターニング(図2)

フローセル内に1 mg/ml BSA-biotin, 1 mg/ml ストレプトアビジン固定した。キネシンを含むbottom phaseとダイニンを含むtop phaseをそれぞれ分取した。上述のガラス基板表面をアッセイバッファ(BRB80)で一度洗い流し、キネシン-bottom phase, ダイニン-top phaseの順に滴下し固定した。このフローセルにAlexa488標識のPolarity marked microtubule: Alexa-PMMTと、退色防止剤を含む1 mM ATP溶液を導入し蛍光顕微鏡で観察した。それぞれの領域でキネシンまたはダイニンによる微小管運動が観察された。

③逆極性モータによる分子綱引きの評価に関する研究

・キネシンとダイニンを用いた分子系の構築

先述の②によるATPSを用いた異種モータのパターニング技術を用いて、キネシンとダイニンの分子綱引き系の構築を試みた。2種類のモータタンパク質の境界部に存在する微小管の運動を解析した。

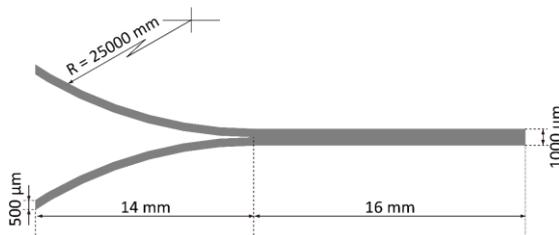


図1 Y字流路のデザイン

・運動速度, モータ数の計測

上述の②においてパターンニングの際, 混在したポリマーが微小管運動速度に影響することがわかったが, PEGおよびDEXが個別にどのように微小管速度に影響するかを検討した.

④粗視化モデルによる数値解析

・分子綱引き系の粗視化モデルの構築

モンテカルロ法を用いたキネシンとダイニンの綱引き系の粗視化モデルの作成をおこなった. 本モデルにおいては, 各モータのヘッドはポアソニアンステッパーとしてふるまい, またモータの胴体はフックの法則にしたがうバネとして近似した. 微小管に作用するすべてのキネシン分子およびすべてのダイニン分子による力を重ね合わせ, 時間ステップごとの微小管の変位を算出した.

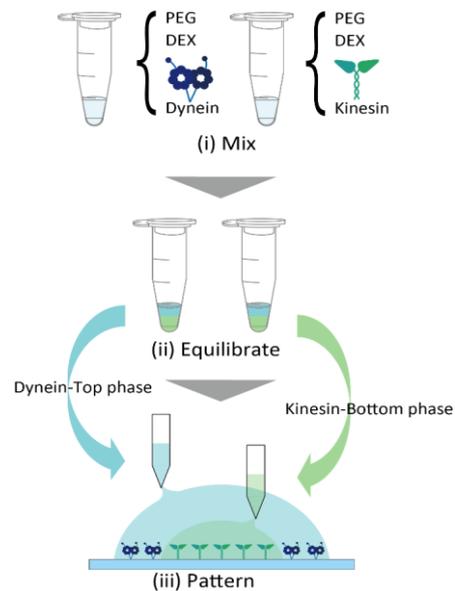


図2 ATPSによる異種モータタンパク質固定の概略

4 本研究が実社会にどう活かされるかー展望

モータタンパク質に限らず, 三次元構造を有するとともにその構造変化を伴って機能を発揮するタンパク質は, 従来のディップペンリソグラフィなどの方法が適用しにくい. これに対し, ATPSを用いることでより生体適合性が良い環境下でのマイクロパターンニングが可能になる. このような技術は, 直接的な受益者である生物物理学分野, 医学・創薬分野の研究者にとって利用しやすいものであり, マルチスクリーニングに適用されることが期待される.

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

我々は, マイクロ・ナノ加工技術を基板として, 分子スケールから細胞・組織スケールまでシームレスにマイクロ・ナノ加工技術との融合を図ることを目指している. 今回の研究課題では, 加工技術に加え高分子材料の特長を用いたATPSを組み合わせることによって, あらたなタンパク質のパターンニング技術を提案することができた. 今後も, 学術的には, 測定対象としてマルチモータでの機能が重要と言われるEg5, Ncd, CENP-E等の有糸分裂キネシンや, 繊毛・鞭毛を構成するダイニンへの適用を通して分子機構の理解に貢献する.

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

- [1] T. Nakagawa, S. Oohara, T. I. Farhana, R. Yokokawa, "Patterning of different motor proteins using aqueous two-phase system," The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Berlin, Germany, 2019/06/23-27 (Poster)

- [2] T. Kaneko, S. Ohba, K. Furuta, K. Oiwa, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Different coordination of kinesin-1 and Ncd revealed by their selective immobilization on gold nano-pillars," Biophysical Society 62nd Annual Meeting, San Francisco, California, USA, 2018/02/17-2/21 (Poster)
- [3] 中川倫宏 新宅博文, 小寺秀俊, 横川隆司, "マイクロチャネル内における ATPS を用いたモータタンパク質のパターニング," 電気学会全国大会, 九州大学伊都キャンパス, 2018年3月14-16日.
- [4] 中川倫宏 大原駿平、新宅博文, 小寺秀俊, 横川隆司, "Aqueous Two-Phase System(ATPS)による異種モータタンパク質のパターニングとその評価," 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 1G06, 京都, 2017年12月14-15日.
- [5] 中川倫宏 大原駿平、新宅博文, 小寺秀俊, 横川隆司, "ATPSを用いた異種モータタンパク質の選択的固定とその評価," 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 広島, 2017年10月31-11月2日.

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし.

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし.

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 京都大学大学院工学研究科(キョウトダイガクダイガクインコウガクケンキュウカ)
マイクロエンジニアリング専攻(マイクロエンジニアリングセンコウ)
ナノシステム創成工学講座(ナノシステムソウセイコウガクコウザ)
ナノメトリックス工学分野(ナノメトリックスコウガクブンヤ)

住 所: 〒615-8540

京都市西京区京都大学桂 CⅢ棟 横川研究室

担 当 者: 准教授 横川隆司(ヨコカワリュウジ)

担 当 部 署: 横川研究室

E - m a i l: yokokawa.ryuuji.8c@kyoto-u.ac.jp

U R L: <http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/>